Aus der Haematologischen Abt. (Leiter Priv.-Doz. Dr. H. Gerhartz)
der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin
im Städt. Krankenhaus Westend

Direktor: Professor Dr. med. Dr. sc. h. c., Dr. med. vet. h. c., Dr. med. h. c.
Hans Freiherr von Kreß

Die Einwirkung der Cytostatica Endoxan und Trisaethyleniminobenzochinon auf das Knochenmark und periphere Blut der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ute Romkopf geb. Bierbrauer
aus Leipzig

1962

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Ewald Harndt

Referent: Priv. Dozent Dr. med. Heinrich Gerhartz

Korreferent: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 1. Feb. 1962

Die Erfahrungen mit der zytostatischen Therapie brachten in den 13 Jahren ihrer bisherigen klinischen Anwendung vor allem Erfolge bei Leukosen und Lymphoblastomen, ein Ergebnis, das weniger auf die Entwicklung stärker wirksamer Cytostatica zurückzuführen ist, als auf deren bessere Verträglichkeit, auf Erfahrungen in der Dosierung und auf eine gezielteren Indikationsstellung [18, 19, 21]. Infolge der jedem Cytostaticum eigenen optimalen Indikation war es wichtig, diese relative Selektivität grundsätzlich nachzuweisen und für jedes einzelne Cytostaticum zu bestimmen [17]. Da Cytostatica allgemeine Proliferationsgifte sind, richtet sich die Selektivität ihrer Wirkung vorwiegend gegen Gewebe mit höherer Proliferationstendenz, insbesondere die Hämopoese [17]. So wirkt *Myleran* und z. T. auch *Thio-Tepa* besonders auf myeloisches Gewebe, während das erythropoetische System stärker durch *Folsäureantagonisten* beeinflußt wird. *N-Lostderivate,* Röntgenstrahlen und *Aethylenimine* treffen besonders das lymphopoetische Gewebe. Retotheliosen, bei denen sich Eiweiße als Fasern im Gewebe fixieren, oder Retikulosen des lymphatischen Gewebes und des Knochenmarks, bei denen die gesteigerte Eiweißproduktion mit einer Paraproteinämie einhergeht, werden besonders günstig durch *Lostphosphamidester* wie *Endoxan* beeinflußt [20, 23].

Über die Selektivität der Cytostatica bei Neoplasien ist noch wenig bekannt. Als zytostatisch besonders erreichbar erwiesen sich klein-

zellige Karzinome, besonders solche hoher Malignität wie metastasierende Mamma- und Bronchialkarzinome und Seminome, sowie auch Ovarialkarzinome [17, 21]. Die begrenzte Selektivität der Cytostatica bedingt es, daß bei der chronischen Therapie der Karzinome Seiteneffekte – insbesondere solche auf die Hämopoese – große klinische Bedeutung besitzen, weil Thrombopenie und Agranulozytose die Höhe der zytostatischen Dosierung beschränken. Entscheidend für die pharmakologische Bewertung eines Cytostaticum ist die Klärung der vollständigen Dosis-Wirkungsbeziehungen [7]. Da es bei der klinischen Anwendung notwendig wird, die Substanz in einer möglichst voll wirksamen, d. h. tumorhemmenden Dosis zu verabreichen, die zugleich möglichst geringe toxische Nebenwirkungen haben soll, müssen der letale, der leukotoxische, der kumulierende und der kurative Effekt eines Cytostaticum im Tierexperiment zuvor geklärt sein. Die therapeutische Wirkung eines Cytostaticum ist um so größer, je schneller die toxische und je langsamer die kurative Wirkung reversibel ist. Ihr klinischer Wert wird nicht von der Dosisgröße, sondern von der therapeutischen Breite bestimmt, die das Verhältnis der letalen Dosis zur kurativen darstellt [7].

Der zytostatische Effekt steht nicht nur in Abhängigkeit von der Reaktivität des Präparates und seiner Dosis, sondern auch von der Selektivität seiner Wirkungsrichtung [22, 23]. Die Aufzeigung einer derartigen Wirkungsselektivität war die Fragestellung experimenteller Testungen an der Hämopoese, die wir mit zwei derzeit im Vordergrund der Diskussion stehenden Präparaten ausführten:

Methodik: Wir verwandten männliche Albinoratten eines Inzuchtstammes, deren Fütterung mit einem standardisierten Preßfutter erfolgte. Die Dosierung des zu testenden Cytostaticums wurde einmalig intraperitoneal vorgenommen in einer in Vorversuchen ermittelten Höhe, die eine Depression der Leukozyten im peripheren Blut auf 10% des Ausgangswertes gewährleistete. Hierdurch wurde eine vergleichende Testung verschiedener Cytostatica möglich [4, 9, 10, 12, 22, 24].

An der Schwanzvene von jeweils 4 Versuchstieren erfolgte täglich zur gleichen Tageszeit die Bestimmung des peripheren Blutzellgehaltes (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten), sowie des Differenzialblutbildes. Berechnung der Mittelwerte und ihres prozentualen Abfalles bzw. Anstieges gegenüber mehrfachen vorherigen Kontrollbestimmungen (= 100%-Wert).

Die Bestimmung des Knochenmarkzellgehaltes erfolgte am Femur von jeweils 2 Ratten in täglichen, später mehrtägigen Abständen nach Tötung der Versuchstiere mit Leuchtgas. Nach Bestimmung der absoluten Gesamtzellzahl mittels des Sandkühlerschen Spezialokulars [31] wurde die Differenzierung des relativen Zellbestandes im Ausstrich durchgeführt. Umrechnung der Relativwerte in Absolutwerte; Errech-

nung der Mittelwerte und deren prozentualer Verschiebung gegenüber mehrfachen Kontrollbestimmungen vor Versuchsbeginn.

Bei der Differenzierung der Granulopoese und der Lymphozyten im Knochenmark der Ratte ergaben sich im Vergleich mit den Werten von Elson, Galton und Till [14] Unterschiede, die durch die verschiedene Nomenklatur zu erklären sind. Bei den eigenen Untersuchungen wie auch bei der Aufstellung der Normalwerte von Köhler [25, 30, 32] wurden die Myeloblasten mit bei der Granulopoese erfaßt, während bei den englischen Autoren die Granulopoese erst von den Promyelozyten ab gerechnet wurde. Die Lymphozyten sind im Knochenmark der Ratte nur spärlich vorhanden; doch gibt es praktisch weder eine morphologische noch histochemische Methode, um Myeloblasten und Lymphozyten sicher zu differenzieren.

Normalwerte

Peripheres Blut (Mittelwert von 160 Ratten)

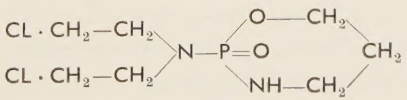
Erythrozyten	6,1 Mill.
Retikulozyten	55‰
Thrombozyten	488000
Leukozyten	14900
Segmentkernige	19,4%
Lymphozyten	80,6%

Knochenmark (Mittelwert von 7 Ratten)

Gesamtzellgehalt	801000/cm²
Erythropoese	278000 = 34,7%
Granulopoese	463000 = 56,3%
Myeloblasten bis Myelozyten	261000 = 31,3%
Stab- und Segmentkernige	202000 = 25%
Plasmazellen	48000 = 6%
Lymphozyten und Monozyten	22000 = 2,8%
Megakaryozyten	1600 = 0,2%

I. Endoxan

Endoxan (N, N-bis-(β-chloraethyl)-N, O-propylenphosphorsäureesterdiamid



ist gut wasserlöslich. In seiner Eigenschaft als Phosphamid besitzt es durch seine elektrophile P = O-Gruppe eine verminderte Basizität, die zur Abschwächung der Aktivität der funktionellen Gruppen führt. Am peripheren Blutzellbild des Menschen führt *Endoxan* bei einer mittleren

klinischen Dosis (3,3 g/3 Wochen) im Verlauf der 2.–3. Therapiewoche zu einer Leukopenie von 50% des Ausgwangswertes, die jedoch gut reversibel ist [20, 23]. Dabei werden die Thrombozyten wesentlich später und verhältnismäßig gering gemindert, während die Erythrozytenzahl im Bereich der Norm bleibt. Nach Absetzen der Therapie beginnt mit dem 10. Tag eine rasche Normalisierung.

Die DL_{50} beträgt für die Ratte 160 mg/kg [7]. Wir injizierten bei 30 Ratten einmalig intraperitoneal 200 mg/kg. Hiernach verschlechterte sich das Allgemeinbefinden der Tiere vom 3. Tag an sichtlich unter Haarausfall und gallertigen bis wäßrigen Durchfällen. 6 Tiere starben innerhalb des 6.–9. Tages nach Versuchsbeginn unter den Zeichen massiver Schleimhaut- und Darmblutungen bei ausgeprägter Thrombopenie und Granulopenie. Mit dem 8.–12. Tag besserte sich das Allgemeinbefinden der Tiere rasch. Das täglich kontrollierte Gewicht minderte sich bereits am 1. Versuchstag erheblich, jedoch kam es vom 7. Tage an wieder zu einer langsamen Gewichtszunahme, wenngleich das ursprüngliche Gewicht bei Versuchsende noch nicht wieder erreicht war.

a) *Peripheres Blutzellbild* (Abb. 1)

Bereits am 1. Tag nach Versuchsbeginn sanken die *Lymphozyten* auf 20% des Ausgangswertes und erreichten ihre maximale Depression von 2% am 2.–6. Tag. Mit dem 7. Tag setzte eine langsame Regeneration ein, die am 11. Tag Werte über dem Ausgangswert zeigte.

Ein rasch einsetzender Abfall der *Granulozyten* hatte am 4.–6. Tag mit Werten unter 1% sein Minimum erreicht. Bereits am 6.–7. Tag setzte eine rasche Regeneration mit überschießenden Werten ein, die am 11. Tag ein 4faches des Ausgangswertes überschritten hatten.

Der Abfall der *Thrombozyten* setzte zögernd ein und erreichte erst am 6.–7. Tag seine niedrigsten Werte mit 6%. Nach rascher Regeneration zeigte sich am 12. Tag ein Gipfel, der um 50% über dem Ausgangswert lag.

Die *Erythrozyten* wurden wesentlich geringer beeinflußt und erreichten erst am 7. Tag ihr Minimum von 56%. Bei geringfügigen Schwankungen hielten sich die Werte um 70–80%. Stärker beeinflußt zeigten sich die *Retikulozyten*, die nach raschem Abfall um den 4.–6. Tag fast vollständig aus dem Blut verschwunden waren, sich nun aber wieder rasch erholten mit einem ersten Gipfel am 12. und einem zweiten am 17. Tag, der fast das 3fache des Ausgangswertes erreichte.

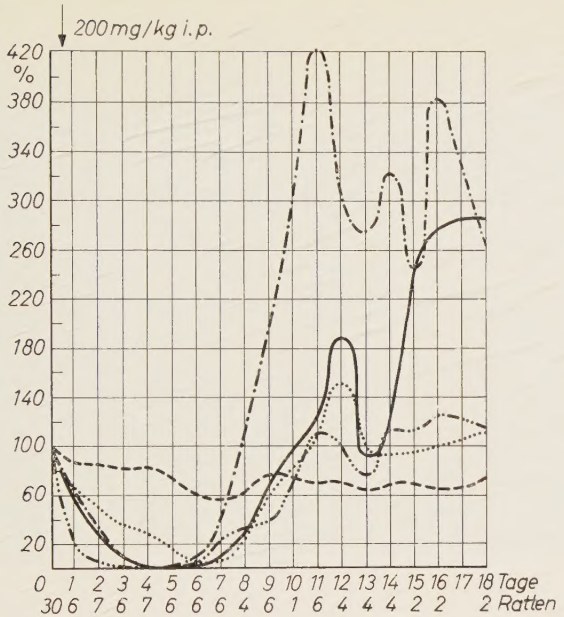


Abb. 1. Zellverschiebungen im peripheren Blut nach 200 mg/kg *Endoxan* i. p. Granulozyten: –.–.– Lymphozyten: –...–...– Erythrozyten: ---- Retikulozyten: —— Thrombozyten: .....

b) *Knochenmarkzellbild*

Das normalerweise fettfreie graurote, gelatinöse Knochenmark der Ratte (Abb. 2) zeigte besonders um den 4.–6. Tag eine zunehmende Verflüssigung und tiefrote Farbe, die gegen Ende des Versuches einer roten oder weißen Hyperplasie wich. Mit dem 2.–3. Tag setzte eine lipoide Metaplasie ein (Abb. 3), die am 4.–5. Tag besonders stark ausgeprägt war (Abb. 4), aber mit dem 8.–11. Tag wieder weitgehend verschwand (Abb. 5). Lymphoide Retikulumzellen und Plasmazellen waren besonders am 2.–3. Tag häufiger vorzufinden (Abb. 3).

Entsprechend der allgemeinen Reifungshemmung der Granulo- und Erythropoese sank auch die *Gesamtzellzahl* (Abb. 6), die am 6. Tag mit 50% ihr Minimum erreichte und nach geringen Schwankungen am 18. Tag zu den Ausgangswerten zurückgekehrt war.

Die *Granulopoese* zeigte zunächst eine stetig fortschreitende Depression, die kurzfristig am 6. Tag einen maximalen Abfall auf 55% erreichte, aber mit dem 9. Tag wieder normalisiert war. Entsprechend der überstürzten Ausreifung der Granulozyten fand sich am 1. Tage ein

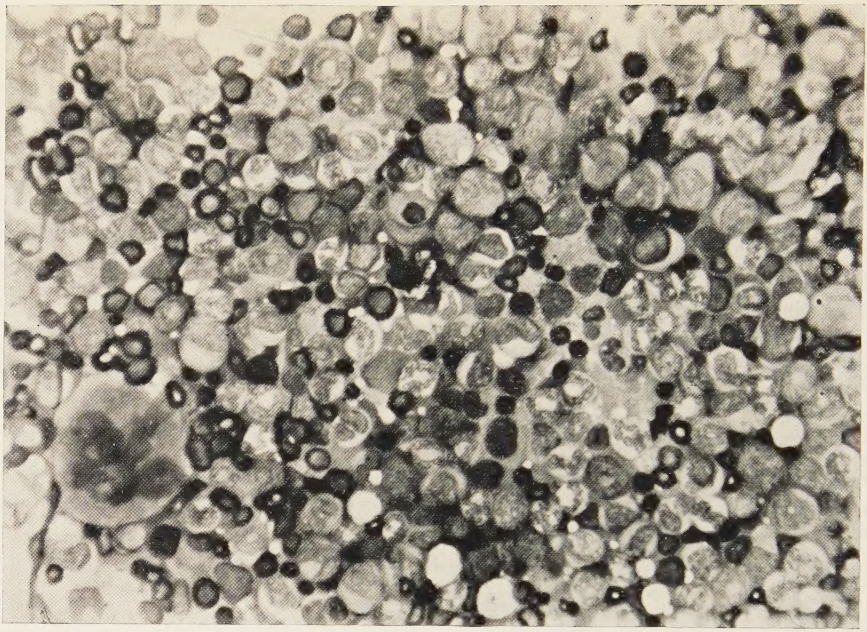


Abb. 2. Normales Knochenmark einer 200 g schweren Ratte vor Versuchsbeginn. Vergrößerung: 830×

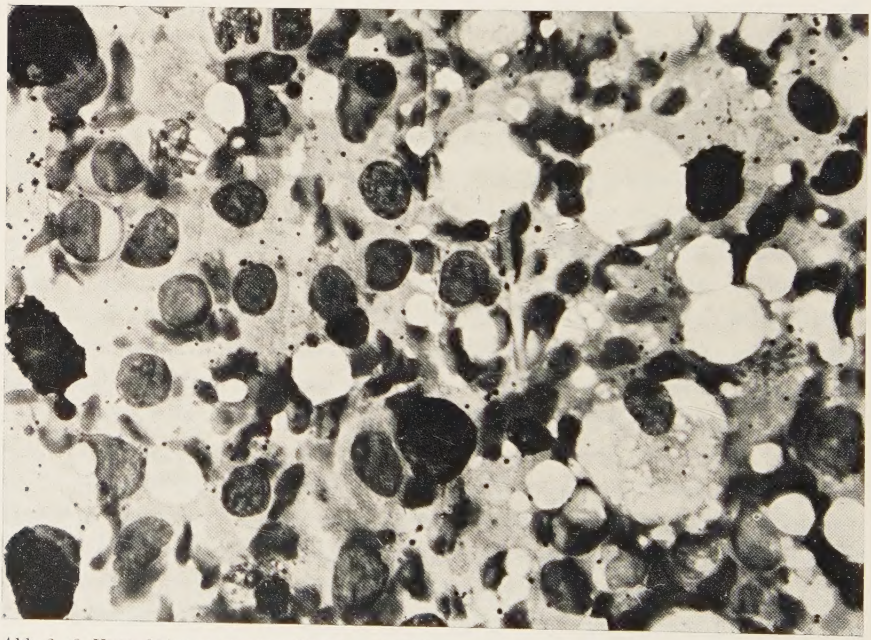


Abb. 3. 2. Versuchstag nach einmaliger i.p. Injektion von 200 mg/kg Endoxan. Deutliche Minderung des Zellgehaltes unter Bildung großer und kleiner Fettvakuolen. Minderung der reifen Granulopoese mit relativer Zunahme der Promyelozyten und Myeloblasten. Auffällige Vermehrung der basophilen Myelozyten. Fast vollständiger Verlust der Megakaryozyten. Nur angedeutete Minderung der Erythropoese. Vergrößerung: 1000×

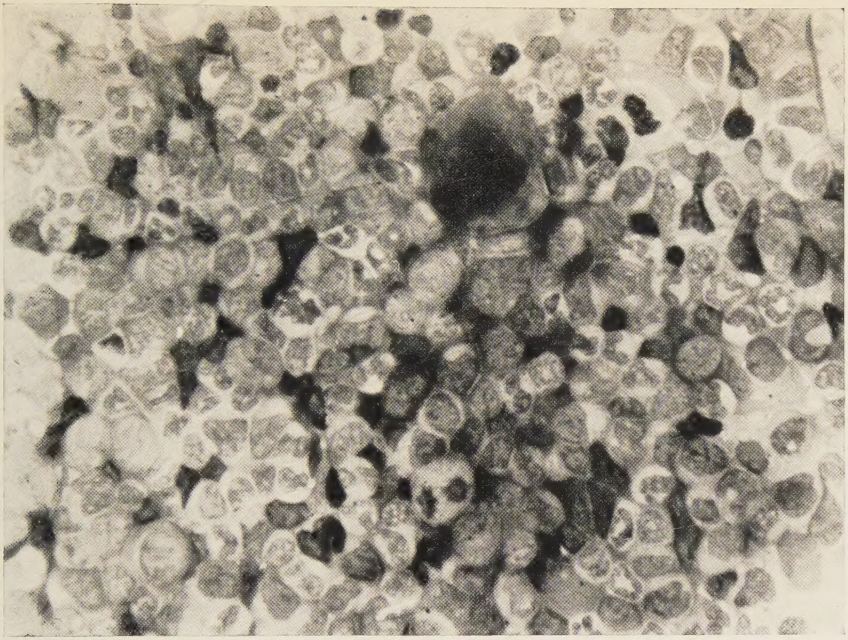


Abb. 4. 5. Versuchstag. Extreme Minderung des Gesamtzellgehaltes bei intensiver lipoider Metaplasie. Vollständiger Verlust der reifen und halbreifen Granulopoese bei relativer Zunahme der Retikulumzellen. Auch deutliche Minderung der Erathropoese. Vollständiger Verlust der Megakaryozyten. Vergrößerung: 550×

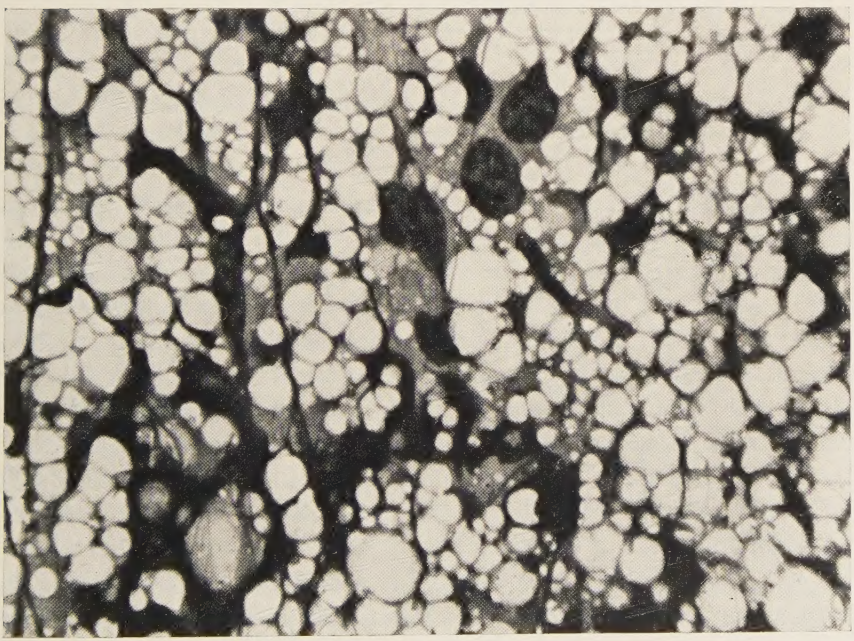


Abb. 5. 11. Versuchstag. Normalisierung des Gesamtzellgehaltes und der Granulopoese, jedoch noch verminderte Erythropoese und Thrombopoese. Vergrößerung: 550×

Absinken der unreifen Granulopoese (Myeloblasten bis Metamyelozyten), gefolgt von einem über den 2.–5. Tag anhaltenden deutlichen Anstieg, der wohl als erster Ausdruck der Regeneration der Granulopoese zu deuten war (Abb. 7). Nach vorübergehendem Rückfall auf den Ausgangswert am 6. Tag erfolgte ein zweiter Regenerationsgipfel am 7.–9. Tag. Vom 2.–6. Tag war eine stärkere Basophilie nachweisbar.

Die stab- und segmentkernigen Granulozyten im Mark zeigten nach einem flüchtigen initialen Anstieg einen, dem Abfall im peripheren

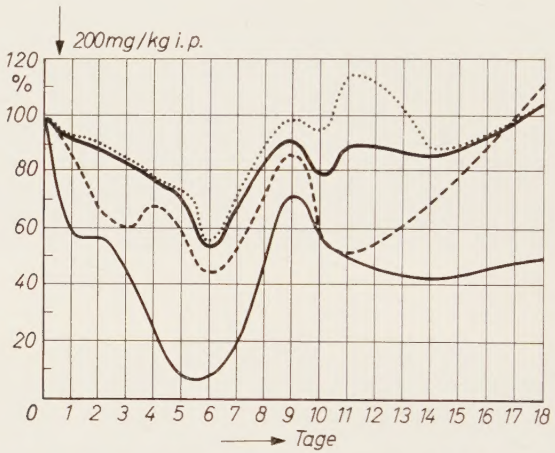


Abb. 6. Veränderungen des Zellgehaltes im Knochenmark nach *Endoxan* (200 mg/kg i. p.) Gesamtzahl: —— Granulopoese: ..... Erythropoese: – – – – – Megakaryozyten: ——

Blut etwa parallel verlaufenden rapiden Sturz mit Minimumwerten unter 10% am 3.–7. Tag. Dem folgte vom 8. Tag an eine rasche, vom 10. Tag an überschießende Erholung. Die Mitosen der Granulopoese sanken schon am 1. Tag rasch ab und zeigten am 3.–4. Tag einen maximalen Abfall auf 7%. Die Regeneration begann am 6. Tag und erreichte am 10. ihren Höhepunkt mit Werten von 270%, die mit dem 13. Tag zur Norm zurückkehrten. Die intensive Minderung der Mitosen war die erste Reaktion der Granulopoese nach der zytostatischen Behandlung überhaupt. Die überschießende Zunahme der Mitosenzahl lief dem Anstieg der Granulozytenzahl im peripheren Blut um etwa 1–2 Tage voraus.

Zwischen den Veränderungen im peripheren Blut und den im Knochenmark bestehen deutliche Relationen: Der initiale Abfall der Granulozyten des peripheren Blutes und der reiferen Granulozyten des

Knochenmarks erfolgt fast gleichzeitig und unterscheidet sich nur durch den kurzzeitigen Anstieg der Segmentkernigen im Mark am 1. Tag. Die Minderung der reiferen Granulozyten beginnt im Mark einen Tag nach der des peripheren Blutes und verschwindet ebenfalls einen Tag später. Die Erholung der Granulozyten im Blut erfolgt rascher, zeigt extreme Gipfel und verläuft etwa spiegelbildlich zur vorausgegangenen Senkung. Die Regeneration im Mark erfolgt demgegenüber langsamer, zeigt geringere Gipfel und weniger ausgeprägte Schwankungen. Das Maximum ist im Mark wie auch im peripheren Blut gleichzeitig am 11. Tag. Während der Dauer der Granulozytendepression zeigt die unreife Granulopoese im Mark ihre höchsten Gipfel als Ausdruck einer intensiven Regenerationsreizung. Mit Ausgleich der peripheren Granulopenie kommt es zu einer schubweisen Normalisierung. Dem ersten Regenerationsgipfel im Mark folgt der erste Granulozytengipfel im peripheren Blut im Abstand von 8 Tagen, dem zweiten nach 6 Tagen, dem dritten nach 5 Tagen. Sowohl im Hinblick auf die zeitlichen Abstände als auch auf die Intensität der Ausschläge läßt sich mit

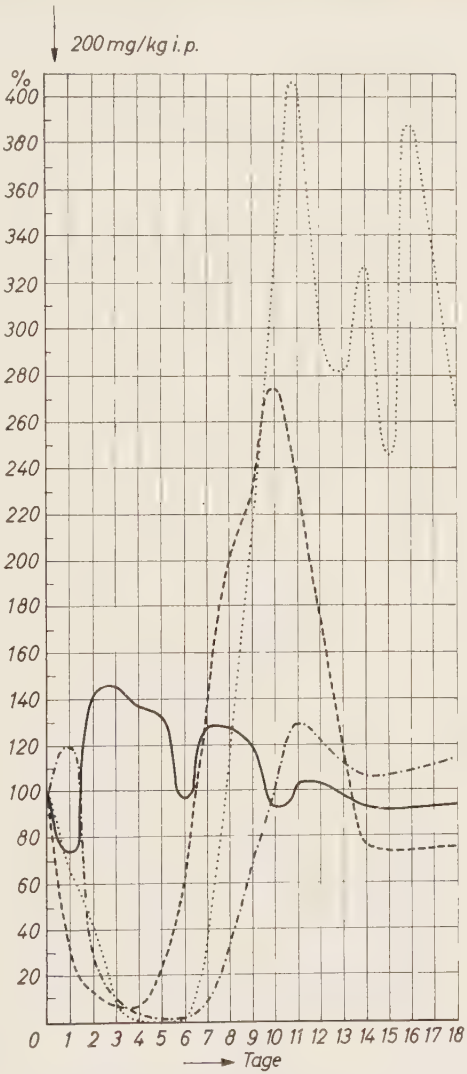


Abb. 7. Beeinflussung der Granulopoese durch *Endoxan*. Granulozyten im peripheren Blut: ..... Stab- u. Segmentkernige Granulozyten im Mark: –.–.–. Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten im Mark: —— Mitosen der Granulopoese im Mark: – – – –

zunehmendem Abstand von der Injektion eine deutliche Verringerung erkennen.

Die *Erythropoese* des Knochenmarks ließ um den 6. Tag ein Minimum von 44% erkennen (Abb. 8). Nach einer kurzen Erholung bis

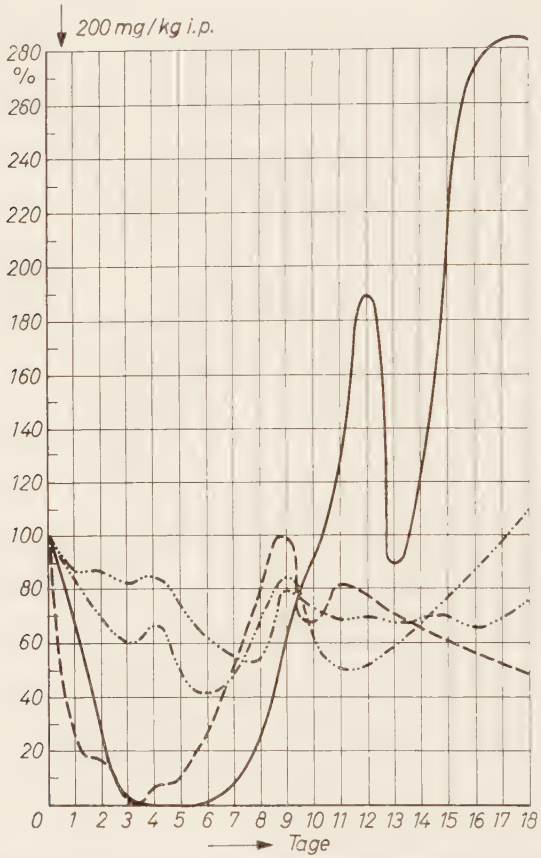


Abb. 8. Beeinflussung der Erythropoese durch *Endoxan*. Erythrozyten im Blut: –...–...– Erythroblasten im Mark: –..–..– Mitosen der Erythropoese im Mark: –––– Retikulozyten im Blut: ———

nahe 90% kam es um den 11.–12. Tag zu einem zweiten Abfall, der etwa ebenso intensiv ausgeprägt war wie der erste. Eine vollkommene Regeneration war aber am 17. Tag erreicht. Die Mitosen der Erythropoese zeigten ebenso wie die der Granulopoese einen raschen Abfall bis zum fast völligen Verschwinden am 3.–5. Tag. Dem folgte am

8.–9. Tag eine kurzfristige Normalisierung. Dem Mitoseanstieg im Mark entsprach jeweils 3–5 Tage später ein Retikulozytenanstieg im peripheren Blut. Obgleich der Abfall der Retikulozyten im Blut intensiv war, blieb die Erythropoese relativ gering beeinträchtigt. Die Minderung der Erythrozyten im Blut entsprach zeitlich und der Intensität nach im wesentlichen der Hemmung der Erythropoese im Mark.

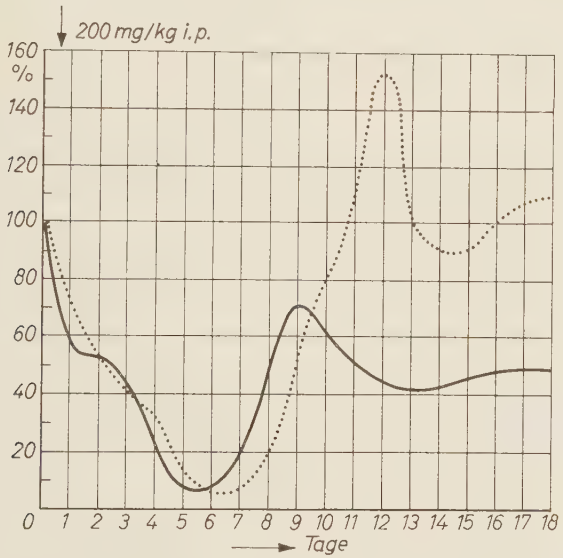
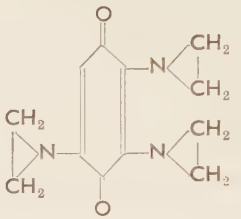


Abb. 9. Beeinflussung der Thrombopoese durch *Endoxan*
Thrombozyten im Blut: ..... Megakaryozyten im Mark: ———

Thrombopoese: Den Thrombozyten im peripheren Blut entsprechend verhielten sich die Megakaryozyten im Knochenmark (Abb. 9): Ein verzögert einsetzender Abfall fand seine Tiefstwerte mit 7% am 5.–6. Tag, wobei die Minderung der Thrombozyten der der Megakaryozyten im Mark fast konstant um jeweils einen Tag nachhinkte. Die folgende Regeneration erreichte hingegen vorübergehend Werte bis 70%. Einem Megakaryozytengipfel am 9. Tag entsprach am 12. Tag ein Maximum der Thrombozyten. Trotz der Normalisierung der peripheren Thrombozytenzahl – etwa vom 13. Tag an – blieb der Gehalt an Megakaryozyten im Mark konstant um 50% vermindert, wohl Ausdruck einer wesentlich verkürzten Thrombozytenreifungszeit.

II. Trisaethyleniminobenzochinon

Im 2,3,5-tris-aethylenimino-benzochinon- (1,4) („*Trenimon*" = Bayer-3231)



ist im Vergleich zum Bayer-E 39 die Reaktivität des Moleküls durch Einführung einer dritten Aethylenimingruppe erheblich beschleunigt und gesteigert. *Trenimon* stellt eine in kaltem Wasser wenig lösliche, in warmem Essigwasser gut lösliche kristalline Substanz dar, die bei Berührung mit Säuren, Alkoholen oder Reduktionsmitteln sofort reagiert. Am menschlichen Knochenmark in vitro senkt es den Mitoseindex in einer Intensität, die etwa in der Mitte zwischen der von TEM und Bayer-A 139 gelegen ist [17]. Am peripheren Blut des Menschen zeigt *Trenimon* unter der klinischen Dosierung (5 mg/5 Tage) eine intensive, aber wenig selektive Hemmwirkung auf die Hämopoese, die ihr Maximum erst in der 2.–4. Woche erreicht [3].

Trenimon wurde unseren Versuchstieren in einer Dosis von 0,25 mg/kg einmalig intraperitoneal injiziert. Hiernach war das Allgemeinbefinden der Ratten durch die allgemeine Toxizität der Substanz stark beeinflußt, wobei die Verschlechterung später einsetzte als beim *Endoxan*, dann allerdings wesentlich lebhafter. Von 17 Versuchstieren starben 8 im Verlauf des 4.–8. Versuchstages. Meist traten am 5. Tag starke, zunächst gallertige, später hämorrhagische Durchfälle auf; dabei setzte ein erheblicher Gewichtsverlust ein mit Minimum am 6. Tage. Die überlebenden Tiere erholten sich vom 10. Tag an rasch.

a) *Peripheres Blutzellbild* (Abb. 10)

Bereits vom 1. Versuchstage an reagierten die *Lymphozyten* mit einem raschen Abfall, wobei Minimumwerte von 9% am 3. Tag erreicht wurden. Die verzögert einsetzende Regeneration zeigte noch am 12. Tag erst Werte von etwa 50%.

Die *Granulozyten* ließen am 1.–2. Tag einen Anstieg bis auf 200% erkennen, wohl infolge einer überstürzten Ausschwemmung ins Blut.

Dem folgte ein rapider Granulozytensturz, der am 3. Tag mit 4% sein Minimum erreichte. Die rasch einsetzende überschießende Regeneration erreichte am 12. Tag etwa 260%.

Die *Thrombozyten* fielen nach einem geringen initialen Anstieg zögernd und stufenweise unter Schwankungen ab mit einem ersten Tiefstwert am 5. Tag und einem Minimalwert von 29% am 7. Tag. Die danach langsam einsetzende Regeneration hatte am 12. Tag den Ausgangswert fast wieder erreicht.

Die *Erythrozyten* zeigten auch hier eine wesentlich geringere Empfindlichkeit als die übrigen Blutzellen. Einem geringen initialen Abfall am 3. Tag erfolgte am 8. Tag ein stärkerer Abfall mit einem Tiefstwert bei 68%; am 12. Tag lagen die Werte noch um 80%. Die *Retikulozyten* sanken nach einem geringen initialen Anstieg rapid ab bis zu einem völligen Schwund am 3. Tag. Die Regeneration war unter Schwankungen am 12. Tag vollständig.

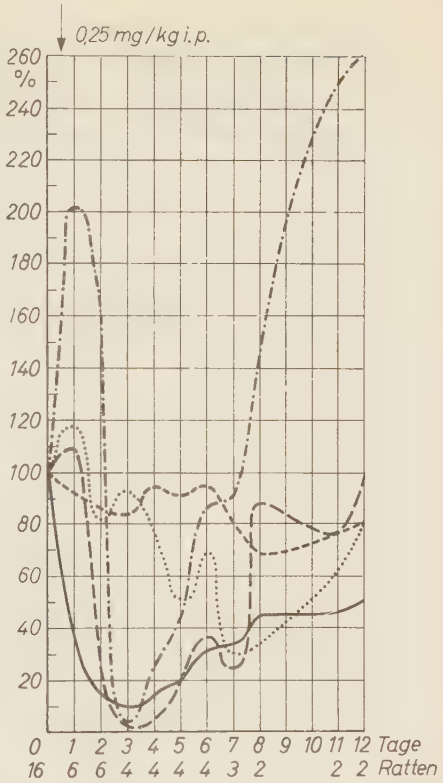


Abb. 10. Beeinflussung des Zellgehaltes im peripheren Blut durch *Trisaethyleniminobenzochinon* (0,25 mg/kg i.p.). Granulozyten: –.–.– Lymphozyten: ——— Erythrozyten: – – – Retikulozyten: ——— Thrombozyten: .....

b) *Knochenmarkzellbild*

Die makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen entsprachen im wesentlichen denen unter *Endoxan*. Besonders am 6. Tag war eine ausgedehnte lipoide Metaplasie nachzuweisen. Die retikulären Zellelemente wiesen am 2.–3., sowie erneut am 6.–7. Tag einen relativen Anstieg auf.

Die *Gesamtzellzahl* sank vom 1. Tag an stetig ab und betrug am 4. Tag nur noch ein Viertel; am 12. Tag war der Ausgangswert fast wieder erreicht.

Die *Granulopoese* (Abb. 11) zeigte ebenso wie beim *Endoxan* einen zum Gesamtzellgehalt weitgehend parallelen Kurvenverlauf. Einem

ersten Minimum von 30% am 4. Tag folgte ein zweites von 60% am 7. Tag. Die Kurve der unreifen Granulopoese (Myeloblast bis Metamyelozyt) fiel bereits am 1. Tag auf 70% ab und nach vorübergehender Regeneration am 4. Tag weiter bis auf 50%. Die danach einsetzende überschießende Regeneration lag am 6. Tag bei 115%. Nach einer geringfügigen dritten Minderung am 7. Tag verblieben die Werte in Höhe des Ausgangswertes. Ein Versuchstier zeigte am 2. Tag einen starken Anstieg der Basophilen. Die Eosinophilen verschwanden am 6.–7. Tag völlig, waren aber am 12. Tag wieder normalisiert.

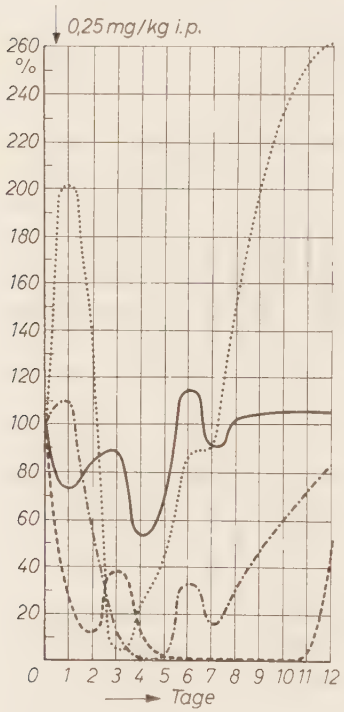


Abb. 11. Beeinflussung der Granulopoese durch *Trisaethylen-iminobenzochinon*. Granulozyten im peripheren Blut: ..... Stab- und segmentkernige Granulozyten im Mark: –.–.–.– Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten im Mark: ——— Mitosen der Granulopoese im Mark: – – – – – – –

Ähnlich wie die Granulozyten im peripheren Blut zeigten auch die Stab- und Segmentkernigen im Mark einen initialen Anstieg, wenn auch nur gering. Der anschließende rasche Abfall erreichte seinen Tiefstwert mit 1% am 4. Versuchstag, gefolgt nach einer kurzfristigen Regeneration von einer zweiten Depression am 7. Tag. Danach begann eine endgültige stete Regeneration, die am 12. Tag den Ausgangswert fast erreicht hatte. Die Mitosen der Granulopoese wiesen vom 1. Versuchstag an einen rapiden Sturz auf mit einer Minderung von 12% am 2. Tag und einem vollständigen Mitoseschwund am 5.–11. Tag, dem dann aber eine rasche Rückbildung folgte. Der Abfall der Stab- und Segmentkernigen im Mark verlief zögernder als im Blut, war aber anhaltender und blieb ohne überschießende Regeneration. Der Anstieg der peripheren Granulozyten ging der Zunahme der Segmentkernigen im Mark etwa 2 Tage voraus.

Die *Erythropoese* (Abb. 12) fand sich bereits am 1. Tag deutlich gemindert und erreichte ihr Minimum mit 24% am 4. Tag. Ihre Regeneration verlief bis zum 8. Tag stetig, verharrte dann aber bei 75%.

Die Mitosen der Erythropoese waren am 4.–9. Tag völlig verschwunden. Der Abfall der Retikulozyten im Blut lag mit seinem Minimum einen Tag vor dem der Erythroblastenmitosen im Mark und erreichte deren Tiefe, hielt jedoch wesentlich kürzer an und zeigte eine unter Schwankungen verlaufende vollständige Regeneration bis zum 12. Tag. Die Minderung der Gesamtzahl der Erythropoese war nicht so ausgeprägt wie die der Retikulozyten, aber wesentlich intensiver als im peripheren Blut. Einem parallel verlaufenden Abfall der beiden Kurven bis zum 3. Tag folgte im Mark ein Minimum der Erythropoese mit 25% am 4. Tag, während sich zur gleichen Zeit im peripheren Blut

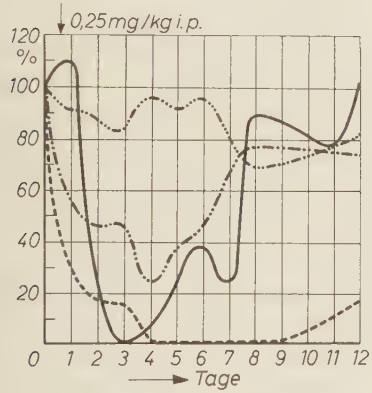


Abb. 12

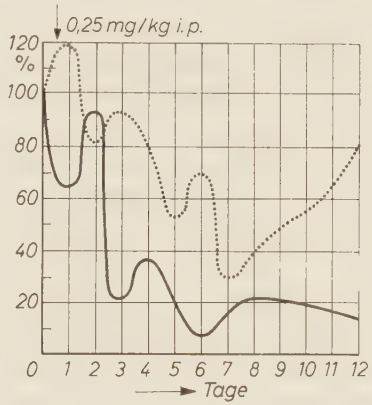


Abb. 13

Abb. 12. Beeinflussung der Erythropoese durch *Trisaethyleniminobenzochinon*. Erythrozyten im Blut: –...–...–...– Erythrozyten im Mark: –.–.–.–.– Mitosen der Erythropoese im Mark: – – – – – Retikulozyten im Blut: ———

Abb. 13. Beeinflussung der Thrombopoese durch *Trisaethyleniminobenzochinon*. Thrombozyten im Blut: ..... Megakaryozyten im Mark: ———

Regenerationsschwankungen bei 95% zeigten. Erst nach dem Minimum der peripheren Erythrozyten am 8. Tag verliefen beide Kurven annähernd parallel.

Thrombopoese (Abb. 13): Bereits am 1. Tag zeigte sich ein Abfall der Megakaryozyten von 35%, dem eine kurzfristige Regeneration am 2. Tag folgte. Aber schon am 3. Tag sanken die Werte auf 20% ab und nach erneuter Regeneration am 6. Tag auf ein Minimum von 7%. Die Regeneration setzte nur zögernd ein und stieg nicht über Werte von 21%. Der Abfall der Megakaryozyten im Mark erfolgte zeitlich

etwa 1–2 Tage vor dem der Thrombozyten im peripheren Blut. Der Anstieg der Thrombozyten verlief vom 8. Tag an stetig, während der Gehalt an Megakaryozyten längere Zeit erheblich unterhalb des Ausgangswertes verweilte.

Diskussion

Eine experimentelle Prüfung der Wirksamkeit verschiedener zytostatischer Stoffe auf die Hämopoese ist bereits verschiedentlich durchgeführt worden [4–6, 8–17, 22–24, 26–27, 29, 33–34]. Die eigenen Versuche zur Testung von *Endoxan* und *Trenimon* ergaben:

Endoxan verursachte in erster Linie eine rasche und anhaltende Depression der Lymphozyten. Erst später und flüchtiger erfolgte der Abfall der Granulozyten, der von einer ausgeprägten granulozytotischen Phase abgelöst wurde. Der thrombopenische Effekt war geringer und flüchtiger. Am wenigsten wurde die Erythropoese beeinflußt. Alle Vorgänge erwiesen sich als gut reversibel. Diese Ergebnisse zeigten eine relativ selektive lymphopenische Wirkung des *Endoxan*, das – verglichen mit anderen Cytostatica – dem *Chlorambucil* am ähnlichsten ist.

Trisaethyleniminobenzochinon (Trenimon) übte eine unspezifischere Wirkung auf die Zellsysteme der Hämopoese aus. Lymphozyten und Granulozyten wurden rasch gesenkt und erreichten ihr Minimum fast gleichzeitig. Während auf die granulopenische Phase jedoch rasch eine granulozytotische folgte, ging die Regeneration der Lymphozyten nur langsam vor sich und blieb längere Zeit unterhalb der Norm. Der thrombopenische Effekt setzte verzögert ein, auch die Erythropoese wurde erst allmählich beeinflußt, dann aber intensiver als durch *Endoxan*.

Ein Vergleich der Ergebnisse der Knochenmarkuntersuchungen zeigte deutlich den stärker toxischen und markhemmenden Einfluß des *Trisaethyleniminobenzochinon*. Schon am 4. Tag nach Versuchsbeginn war die Gesamtzellzahl auf etwa 30% des Ausgangswertes zurückgesunken. Granulo- und Erythropoese wiesen an diesem Tage ihren niedrigsten Wert auf, wobei die Zellen der Erythropoese stärker gemindert wurden und bis zum Versuchsende eine langsame und nur unvollkommene Regeneration zeigten, während die Zellen der Granulopoese rascher anstiegen und nach kurzfristigem zweiten Abfall am 14. Tag zur Norm zurückgekehrt waren. Am stärksten betroffen waren die Megakaryozyten während des gesamten Versuches. Nach starken

Schwankungen erreichten sie ihr Minimum später als alle Zellsysteme am 6. Versuchstag, zeigten dann aber mit einem Abfall auf 7% des Ausgangswertes die ausgeprägteste Depression und verblieben bis zum Ende des Versuches bei anhaltend niedrigen Werten, ohne daß sich eine Regeneration andeutete. Auch im histologischen Bild zeigten sich eine ausgeprägtere lipoide Metaplasie und Einschmelzungsvorgänge, besonders um den 4.–6. Tag. Der Regenerationsvorgang war bei Versuchsende noch unvollkommen.

Endoxan dagegen bewirkte im Mark eine Senkung der Gesamtzellzahl auf 53% des Ausgangswertes am 6. Tag. Zur gleichen Zeit hatten auch hier Granulopoese und Erythropoese ihr Minimum erreicht, wobei die Erythropoese mit einem Abfall auf 44% des Ausgangswertes die ausgeprägtere Depression aufwies. Beide Zellsysteme zeigten eine völlige Regeneration am Versuchsende, die bereits am 7. Tag einsetzte. Am stärksten beeinflußt waren auch hier während des ganzen Versuchsverlaufes die Megakaryozyten. Am 6. Versuchstag wiesen sie mit einem Abfall auf 5% des Ausgangswertes die stärkste Depression auf. Auf die danach einsetzende Regeneration erfolgte am 14. Tag ein zweites, weniger ausgeprägtes Minimum mit einem Abfall auf 43% des Ausgangswertes. Die endgültige Regeneration war bei Versuchsende nur eben angedeutet. Im histologischen Bild fand sich die lipoide Metaplasie weniger ausgeprägt. Trotz der hohen angewendeten Dosis war die Sterblichkeit der Versuchstiere und ihr Intoxikationsbild wesentlich geringer und flüchtiger ausgeprägt als beim *Trisaethylenimino-benzochinon*.

Zusammenfassung

Der Einfluß der Cytostatica *Endoxan* und *Trisaethyleniminobenzochinon* auf das periphere Blut und Knochenmark wurde an weißen Inzuchtratten nach einer einmaligen intraperitonealen Injektion untersucht.

Endoxan (200 mg/kg) bewirkte am peripheren Blut eine intensive und anhaltende Lymphozytenminderung, sowie eine deutliche Verminderung der Granulozyten, der vom 10.–16. Versuchstage eine etwa spiegelbildlich verlaufende granulozytotische Phase folgte. Ein Abfall der Thrombozyten setzte verzögert ein und erholte sich relativ rasch unter einer flüchtigen thrombozytotischen Phase. Im Knochenmark bedingte *Endoxan* eine Hemmung aller Zellsysteme, mit Maximum am 6. Tage, die jedoch nach 17 Tagen weitgehend ausgeglichen war.

Trisaethyleniminobenzochinon (0,25 mg/kg) zeigte eine stärkere allgemeine Toxizität. Es bewirkte am peripheren Blut rascher und flüchtiger als *Endoxan* eine intensive Minderung aller Zellsysteme, wobei dem Abfall der Granulozyten, Thrombozyten und Retikulozyten ein flüchtiger Anstieg vorausging. Während der Granulopenie ebenso wie beim *Endoxan* eine Granulozytose folgte, blieb die Lymphopenie länger erhalten.

Auch im Knochenmark erfolgte die Zellbildungshemmung intensiver und rascher als nach *Endoxan*, aber anhaltender. Beide Cytostatica zeichneten sich durch eine intensive lymphoklastische Wirkung aus. Darüber hinaus hemmte *Endoxan* stärker die Granulopoese, *Trisaethyleniminobenzochinon* hingegen die Thrombopoese.

Summary

The cytostatic effect of a single injection of "Endoxan" and trisethyleniminobenzochinone on the blood and the bone-marrow of white rats was investigated.

Endoxan (200 mg/kg) caused a strong and persistent decrease of lymphocytes and granulocytes, which was follwed by a reflecting granulocytotic phase at the 10th–16th day. The decrease of thrombocytes was delayed and was followed by a quick but transitory thrombocytic phase.

In the bone-marrow a maturation arrest of all cells was noticed with a maximum at the 6th day but only lasting to the 17th day.

Trisethyleniminobenzochinone (0,25 mg/kg) had a more severe toxic effect. In the blood this substance caused – compared to Endoxan – a quicker and more transitory but also a more severe decrease of all cell types with a transitory increase of granulocytes, thrombocytes and reticulocytes at the beginning. Whilst the granulocytopenia was followed by a granulocytosis the lymphopenia lasted longer than with Endoxan.

Also in the bone-marrow the maturation arrest was more severe, it started earlier and lasted longer than with Endoxan. Both cytostatic substances have a severe lymphoklastic effect. Furthermore the granulopoesis is more affected by Endoxan, whereas the thrombopoesis is more affected by trisetheleniminobenzochinone.

Résumé

L'influence des cytostatica «endoxan» et «trisaethylen-imino-benzochinone» sur le sang circulant et sur la moëlle osseuse fut examinée à l'aide de rats d'une parenté consanguine après une seule injection intrapéritonéale.

L'endoxan (200 mg/kg) produisait une diminution de lymphocytes intense et continue dans le sang circulant, ainsi qu'une diminution distincte de granulocytes, suivi d'une phase inverse granulocytotique du 10ème au 16ème jour d'examen.

Une diminution des thrombocytes commençait d'une manière hésitante et se rétablit relativement rapidement sous l'aspect d'une phase thrombocytotique fugitive.

Dans la moëlle osseuse l'endoxan produisait un retard de tous les systèmes cellulaires avec un maximum au 6ème jour. Ce retard fut en effet égalisé presque complètement au bout de 17 jours.

La trisaethylen-immino-benzochinone (0,25 mg/kg) présentait une puissance toxique générale plus forte. Cette substance produisait plus rapidement et plus fugitivement que l'endoxan une diminution intense de tous les systèmes cellulaires dans le sang circulant, pendant laquelle on observait une augmentation fugitive précédant la diminution des granulocytes, thrombocytes et réticulocytes.

Tandis que la granulopénie était – de même qu'avec l'endoxan – suivie d'une granulocytose, on observait une plus longe durée de la lymphopénie.

Aussi dans la moëlle osseuse on constata une inhibition de la formation cellulaire plus intense et rapide qu'après l'application de l'endoxan, cependant d'une durée plus longe.

Tous les deux cytostatica sont caractérisés par un effet lymphoclastique intense. En outre l'endoxan retardait plus intensivement la granulopoïèse, à l'encontre la trisaethylen-imino-benzochinone retardait la thrombopoïèse.

Literatur

1. Arnold, H., und F. Bourseaux, Angew. Chem. **70** (1958) 339, 539.
2. Arnold, H., F. Bourseaux und N. Brock, Naturwiss. **45** (1958) 64.
3. Blum, K.-U., Strahlenther. Sdb. **41** (1959) 396.
4. Bollag, W., Schweiz. med. Wschr. **1953**, 1027.
5. —, Schweiz. med. Wschr. **1956**, 872.
6. —, Schweiz. med. Wschr. **1957**, 817.
7. Brock, N., Arzneimittelforsch. 8 (1958) 1.
8. Brock, N., und H. Wilmanns, Dtsch. med. Wschr. **1958**, 453.
9. Elson, L. A., Radiobiol. Symp. Butterworth, London 1955, p. 235.
10. —, Ann. N. Y. Acad. Sci. **68** (1955) 826.
11. —, Brit. J. Haematol. **1** (1955) 104.
12. —, V. Congr. Europ. Ges. Haematol. (1956). S. 36
13. —, Biochem. Pharmacol. **1** (1958) 39.
14. Elson, L. A., D. Galton, and M. Till, Brit. J. Haematol. **4** (1958) 355.
15. Friederici, L., Z. Krebsforsch. **60** (1955) 553.
16. Gerhartz, H., Strahlenther. Sdb. **37** (1957) 285.
17. —, Habilitationsschr. Berlin 1958.
18. —, Berl. Med. **1959**, 27.
19. —, Ärztl. Wschr. **1959**, 255.
20. —, Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. **65** (1959) 218.
21. —, Wissen u. Praxis **7** (1959) 12.
22. —, VII. Congr. Europ. Ges. Haematol. London 1959.
23. —, in H. Wilmanns: Chemotherapie maligner Tumoren. Schattauer-Verlag, Stuttgart 1960, S. 61, 86.
24. —, Blut **5** (1959) 360.
25. Köhler, H., in Cohrs, P., R. Jaffé und H. Meessen, Pathologie der Laboratoriumstiere **1** (1958) 235.
26. Moeschlin, S., H. Meyer und A. Lichtmann, Schweiz. med. Wschr. **1953**, 999.
27. Musser, A , and R. W. Heinle, Blood **13** (1958) 5.
28. Petersen, S., W. Gauss und E. Urbschat, Angew. Chem. **67** (1958), 217.
29. Philips, F. S., and J. B. Tiersch, J. Pharmacol. **95** (1949) 303.
30. Sacchetti, C. und F. Bianchini, Haematologica [Pavia] **37** (1953) 499.
31. Sandkühler, St., Schweiz. med. Wschr. **1955**, 943.
32. Schermer, S., in Cohrs, P., R. Jaffé und H. Meessen, Pathologie der Laboratoriumstiere **1** (1958) 189.
33. Tischendorf, W. und E. Fritze, Klin. Wschr. **1498**, 179.
34. Voit, K. und H. Hodeige, Med. Klin. **1949**, 1115.

Lebenslauf

Ich, Ute Romkopf geb. Bierbrauer, wurde am 7. Juni 1930 als Tochter des Papiermachers Dr. phil. Karl Bierbrauer und dessen Ehefrau in Leipzig geboren. Meine Kindheit verlebte ich in Fährbrücke bei Zwickau/Sa. Ich besuchte die Grundschule in Langenbach im Erzgebirge und ab 1940 die Oberschule für Mädchen in Zwickau, wo ich 1948 das Abitur bestand. Vom November 1949 bis August 1951 nahm ich an einem Lehrgang für medizinisch-technische Assistentinnen am Heinrich-Braun-Krankenhaus in Zwickau teil, den ich mit dem Staatsexamen abschloß. Ich leitete darauf das Laboratorium der städtischen Hautklinik Zwickau bis zum Herbst 1954.

Im Wintersemester 1954/55 nahm ich das Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin auf und legte im Frühjahr 1961 das medizinische Staatsexamen ab.

Seit dem 23. Dezember 1960 bin ich mit dem Kaufmann Günter Romkopf verheiratet.